

10/070569

JP00/00147

日 本 国 特 許 庁

27.09.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/6147

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 9月10日

REC'D 17 NOV 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第256678号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):明治乳業株式会社
村松 喬

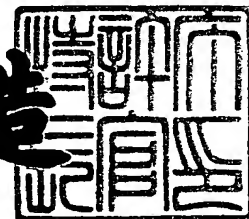
4

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年11月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3089860

【書類名】 特許願
【整理番号】 P99020
【提出日】 平成11年 9月10日
【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県北九州市八幡西区青山 3 - 1 8 - 1 3 - 5 0 2

【氏名】 岡本 好司

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社細
胞工学センター内

【氏名】 池松 真也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社細
胞工学センター内

【氏名】 小田 宗宏

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社細
胞工学センター内

【氏名】 熊井 英志

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社細
胞工学センター内

【氏名】 佐久間 貞俊

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石 2 8 4 5 -
1 6 1

【氏名】 村松 喬

【特許出願人】

【識別番号】 000006138

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

【代表者】 中山悠

【特許出願人】

【識別番号】 591038945

【氏名又は名称】 村松 喬

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 059101

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 早期癌腫瘍マーカー

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 MK タンパク質または該タンパク質と同一の抗原性を示すそのフラグメントからなる早期癌血清腫瘍マーカー。

【請求項 2】 早期癌が腺癌である請求項 1 に記載の腫瘍マーカー。

【請求項 3】 腺癌が胃癌である請求項 2 に記載の腫瘍マーカー。

【請求項 4】 胃癌がステージ 4 である請求項 3 に記載の腫瘍マーカー。

【請求項 5】 早期癌が肝細胞癌である請求項 1 に記載の腫瘍マーカー。

【請求項 6】 肝細胞癌がステージ 2 である請求項 5 に記載の腫瘍マーカー。

【請求項 7】 請求項 1 に記載の腫瘍マーカーの早期癌診断への使用。

【請求項 8】 請求項 1 に記載の腫瘍マーカーに対する抗体を用いる早期癌の免疫学的測定法。

【請求項 9】 免疫学的測定法が 1-ステップサンドイッチアッセイである請求項 8 に記載の免疫学的測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、早期癌腫瘍マーカー、早期癌診断への該腫瘍マーカーの使用、および血清中の該腫瘍マーカーを測定し、その測定値に基づいて早期癌を診断する癌の診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

癌の進展ないし拡大の程度は、早期癌、進行癌、末期癌と表現される。このうち早期癌とは“一般的に小さく、転移も少なく、治療によって永久ないし長期治癒が得られる進行度の癌”として位置づけられる。

早期癌の治療は、切除範囲が狭いために患者への侵襲が少なく、多くの場合は、臓器機能も維持され、生活の質（クオリティオブライフ，QOL）を損なうこ

とが少ない。救命率も100%に近く、費用効果という点でも最も望ましい治療である。前癌病変にも予防的切除か切除できない病変は、ハイリスクとして濃密なフォローアップによって早期に癌を発見し、延命をはかることができる。また、最近では、 β カロチン、レチノイド、インターフェロンなどによる予防的介入実験も開始されている。以上の理由から、早期癌と前癌病変を診断することは重要であり、このためのマーカー物質の意義も大きい。

【0003】

癌細胞、または担がんホストの免疫細胞が癌に反応してつくる、さまざまな物質が知られている。このうち癌細胞がつくるマーカーは、癌がある程度大きくなるまでは血中レベルは、健常人の基準値と変わらないため、血中マーカーの増加から早期癌を診断することは通常は不可能とされている。例外的には、ステージ1から40～50%の陽性率があり、しかもハイリスクを限定できる慢性肝疾患での α -フェトプロテイン (α -fetoprotein : AFP)、高齢男性での前立腺特異抗原 (prostatic specific antigen : PSA) がある。

【0004】

ホストの反応による早期癌の診断には、腫瘍特異抗原に対する自己抗体、急性相反応物質、特異および非特異的な細胞性免疫反応などの報告があるが、まだ実用化されたものはない。この原因は、癌で陽性率が低いこと、非特異的な偽陽性が多く、原因病変を同定することが困難なこと、検査法の再現性が低いこと、などにある。

【0005】

それより有用なのは、癌細胞が作ったマーカーを、直接排泄される検体中に証明する方法である。剥離癌細胞が検体中に検出できなければ細胞診は陰性になるが、癌細胞に特異性の高いマーカーを分泌液中に証明できれば、近傍に癌のある確率が高く、細胞診を補う診断法となる。

【0006】

稲治等は、異常乳頭分泌を主訴として受診した婦人の分泌液中のCEAを測定して、潜血反応も細胞診もともに陰性でCEAだけが高値を示した潜在乳癌症例を発見し、乳頭分泌液中のCEAを測定する診断薬キット (マンモテック) を開

発した。この方法では、腫瘍を全く触知しない乳癌の80%を検出でき、乳腺外来での早期乳癌の診断の補助に有用である。

【0007】

菅野らは、大腸癌組織に特異性の高いモノクローナル抗体を用いたサンドイッチラジオイムノアッセイを開発して、糞便中のCEAを測定し、大腸癌患者の50%に異常値を検出した。

【0008】

現在の腫瘍マーカーの問題点として第1にあげられるのは、早期診断への利用に限界がある点と、これまでの腫瘍マーカーは、量的な変化を見ているに過ぎない点である。よく使われている腫瘍マーカーのAFPも、他の代表的な腫瘍マーカーであるCEA、CA19-9、CA125などと同様、早期診断という点では必ずしも満足のいくマーカーとはいえない。肝疾患が疑われ、AFPがごく微量検出されたときに、肝炎か肝硬変なのか、肝臓癌なのかを調べるのは、AFPの量的変化をみるだけではむずかしい。これを区別するために、AFPのもつ糖鎖の変化をレクチンによる反応性の違いで検出するという方法が試みられている。しかし、この糖鎖の質的变化が見られることは確かであるが、やはりその質的变化は段階的なものであり、癌細胞に特異的と判断するのはむずかしい。その質的变化といえども、わずかな量的な差があるからである。特定の糖鎖が癌細胞のみに出現し、正常組織や良性組織に全く出現しないというのは、量的な違いである可能性が強いからである。また、レクチンとの親和性で判断するのには、レクチンのもつ結合性の弱さからも一定の限界があり、しかもこの方法も定量的には測定できず、やはり早期診断には限界がある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

腫瘍マーカー検査は、現在日常の癌診療において不可欠のものである。現時点では、腫瘍マーカーの測定により、早期癌を診断することは困難であり、早期癌の状態から検出されうる癌特異的な物質の発見、検査法の開発が望まれている。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、肝癌患者において、抗MK抗体により検出されるMKレベルが、健常者や肝炎患者に比べ、肝癌の組織中だけでなく、血中においても、早いステージで有意に増大していることを見出した。さらに、胃癌のについても同様に早いステージで、血中のMKレベルが有意に増大することを見出した。そこで早期癌における血清腫瘍マーカーとして、MKは、これまでの血清腫瘍マーカーにはみられない感度と特異性とを有しており、その測定を酵素免疫測定法で行うことにより全自動化が可能で、早期癌の診断の補助として非常に期待できる。

【0011】

すなわち本発明は、

- (1) MKタンパク質または該タンパク質と同一の抗原性を示すそのフラグメントからなる早期癌血清腫瘍マーカー、
- (2) 早期癌が腺癌である(1)の腫瘍マーカー、
- (3) 腺癌が胃癌である(2)の腫瘍マーカー、
- (4) 胃癌がステージ4である(3)の腫瘍マーカー、
- (5) 早期癌が肝細胞癌である(1)の腫瘍マーカー、
- (6) 肝細胞癌がステージ2である(5)の腫瘍マーカー、
- (7) (1)の腫瘍マーカーの早期癌診断への使用、
- (8) (1)の腫瘍マーカーに対する抗体を用いる早期癌の免疫学的測定法、
- (9) 免疫学的測定法が1-ステップサンドイッチアッセイである(8)の免疫学的測定法

からなる。

【0012】

MKは、分子量13 kDaのヘパリン結合性成長因子で、塩基性アミノ酸とシステインに富む(Kadomatsu, K., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: 1312-1318, 1988; Tomomura, M., et al.: J. Biol. Chem., 265: 10765-10770, 1990)。MKと疾病との関連で最も興味をもたれるのは、癌との関連である。さまざまなヒト癌の多くで、MKの発現は、周辺の正常組織と比較して増強している(Tsutsui J. et al.: Cancer Res., 53: 1281-1285, 1993; Aridome, k., Cancer Res., 86: 655-661, 1995)。大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、食道癌、胃癌

などの消化器癌では、80～90%のケースでMKの発現の上昇が認められる (Aridome, k., Cancer Res., 86: 655-661, 1995)。肺癌 (Garver, R.I., et al.: Cell M l. Biol., 9: 463-466, 1993)、乳癌 (Garver, R.I., et al.: Cancer, 74: 1584-159, 1994)などでも同様である。そして、ニューロblastoma (Nakagawara, A. et al.: Cancer Res., 55: 1792-1797, 1995)、グリオーマ (Mishima, K. et al.: Neurosci. Lett., 233: 29-32, 1997)、膀胱癌 (O'Brien, D., et al.: Cancer Res., 56: 2515-2518, 1996)では、MKの発現が強い症例は、弱い症例よりも予後が悪い。

【0013】

Muramatsuらは、MKに対する高感度のELISAを開発し、肝臓癌患者の血清中のMKレベルを0.6～8 ng/mlのレンジ (range) で検出している (Muramatsu, H. et al.: J. Biochem., 119: 1171-1175, 1996)。しかし、肝臓癌のステージとの相関は検討されていない。

【0014】

本発明の血清中の腫瘍マーカーとしてのMKレベルの測定には、本質的にはどんな測定法を採用してもよい。しかし、通常は、抗体試薬の特異的結合に基づいて測定する免疫学的測定法 (EIA) を用いるのがよい。MKに特異的なポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体が、免疫学的測定法に用いられる。一般的には、そのような測定は、2つの抗体試薬を用いたいわゆるtwo-siteサンドイッチ法が用いられる。

【0015】

この方法は、一般に“forward サンドイッチアッセイ”として知られている。このassayは、有用性が大であるにもかかわらず、2回の洗浄ステップが必要であること、および反応が平衡に達するまでに、長時間のインキュベーションが必要であることから、操作性が遅い。

この操作での洗浄ステップの少なくとも1つをなくすために、1 step サンドイッチアッセイである“simultaneous サンドイッチアッセイ”、および“reverse サンドイッチアッセイ”が行われている。simultaneous サンドイッチアッセイは、固相に結合する抗体と標識抗体を、測定すべきサンプルに同時に加えると

いう、ただ一回のインキュベーションステップを含む。インキュベーション終了後、固相を洗浄して、サンプルの残り、および結合しなかった標識抗体を除く。それから、固相に結合した標識抗体を、通常のforward サンドイッチアッセイと同様に測定する。reverse サンドイッチアッセイは、サンプル中の抗原と酵素標識抗体とを反応させたのち、固相化抗体を加えて反応させ、最終的に免疫複合体を形成させる。反応後、最初、サンプル溶液に対し、標識抗体溶液を加え、適切なインキュベーション後、固相に結合した非標識抗体を加えるステップを含む。インキュベーション後、固相を、サンプルの残り、と未反応の標識抗体溶液を除くために洗浄する。それから、固相に結合した標識抗体を、simultaneous サンドイッチアッセイ、およびforward サンドイッチアッセイと同様に測定する。

【0016】

このsimultaneous サンドイッチアッセイ、およびforward サンドイッチアッセイは、洗浄操作が1回で済み、簡便であるが、両方法には、一つの問題点がある。すなわち、固相化と酵素標識に、同一のポロクローナル抗体を用いると、抗原結合に際して、両相間に競合反応が生じ、測定感度が著しく低下することである (Endo, Y. et al.: Anal. Lett., 15(B16): 1301-1315, 1982)。この競合反応は、両相の抗体量、とくに酵素標識抗体の量を調節することで最小限に抑えることができる。結果として、forward サンドイッチアッセイよりもむしろ高感度の測定が可能な場合もある (Endo, Y. et al.: Anal. Lett., 15(B16): 1301-1315, 1982)。この競合反応を回避するには、抗原分子の複数のたがいに異なるエпитープを認識する2種類のモノクローナル抗体を両相の抗体として用いればよい (Wada, H. G. et al.: Clin. Chem., 25: 1862-1866, 1982)。現在、モノクローナル抗体を用いたsimultaneous サンドイッチアッセイによる測定が主流を占めつつある。勿論、本発明においてもモノクローナル抗体を用いることができる。

【0017】

抗原分子上の、異なるエпитープを認識しうるポリクローナル抗体は、1 step サンドイッチアッセイに好適であり、そのような抗体は、2つの異なる動物種 (例えば、ヤギおよびウマ) から得られることは公知である (特開昭57-16355)。

そして、これらを固相化抗体（ヤギ抗CEA抗血清）と標識抗体（ウマ）に用いて、がん胎児性抗原（carcinoembryonic antigen: CEA）を、simultaneous アッセイで測定した報告（平井秀松：CEA測定法とその臨床的検討．日本臨床，34：168-173，1976）もある。

【0018】

一般に、免疫原が動物由来の生理活性物質である場合、被免疫動物も同様の生理活性物質をもっており、抗原として認識されにくい。MKは、ヒトからアフリカツメガエルに至るまで見出されているが、種間でのタンパク質の保存度は高く、ヒトとマウスのMKでは、87%のアミノ酸同一性がある（Tsutsui, J. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 176: 792-797, 1991）。

動物を免疫する場合、抗原の由来が、進化の度合いにおいて、できるかぎり離れている動物を用いるべきである。哺乳動物から単離された高度に保存されたタンパク質の免疫原性は弱い、ニワトリ、あるいは他の家禽の場合は、このようなタンパク質に対する自己寛容のプロファイルが、哺乳動物のそれとはかなり異なっているので、免疫動物として有益な選択肢である。このようなことから、本発明者らは、哺乳動物間で保存性の高いMKタンパク質に対する免疫動物として、ニワトリを選んだ。

【0019】

抗MKポリクローナル抗体の作製、および精製については、ポリクローナル抗体の作製に関する数多くの文献〔例えば、Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1988)〕を参考にして実施できる。

【0020】

哺乳動物、および鳥類（ニワトリ）に、MKタンパク質を免疫して作製した、2種のMK特異的ポリクローナル抗体は、それぞれ、MKタンパク質分子上のnonoverlappingエピトープに結合するので、固相化と標識抗体に、同じポリクローナル抗体を用いた場合に、抗原結合に際し、両相間での競合反応が起きる問題を回避することができる。その結果、たがいに異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体を両相に用いた、高感度の1-ステップサンドイッチ法が

、本発明の2種類のポリクローナル抗体でも可能である。

【0021】

上記したように、本発明にしたがえば、MKタンパク質のforward サンドイッチアッセイに用いられる、マウス抗MKポリクローナル抗体にかえて、たがいに異なる2種の動物由来の抗MKポリクローナル抗体を、固相化抗体、および液相抗体に用いることにより、reverse サンドイッチアッセイ、およびsimultaneous サンドイッチアッセイを、高感度で行うことができる。

MKタンパク質は、生物学的に同等の活性を有するそれらの断片を含む。MKタンパクの免疫に用いる2種の動物としては、ウサギとニワトリの組合わせが好ましいが、これらに限定されるものではなく、MKタンパク質分子上のたがいに異なるエピトープを認識するポリクローナル抗体が得られる動物種の組み合わせであれば、その組み合わせは本発明の目的に適用できる。その組み合わせとして考えられるのは、例えば、ウサギとヒツジ、ウサギとヤギ、ニワトリとヒツジ、ニワトリと七面鳥、七面鳥とウシ、などである。そして、このような動物種の組み合わせの中でも、一方は、ニワトリや七面鳥のような鳥類を選択することが好ましい。なぜならば、鳥類のMKタンパク質は、哺乳動物同士のMKタンパク質の相同性の程度に比較して、より哺乳動物に対し、相同性が少ないからであり、結果、ヒトMKタンパク質分子上の異なるエピトープを認識する抗体が得られやすいと考えられるからである。とりわけ、ニワトリは、その抗体(IgY抗体)が、その母子免疫を利用して卵黄から比較的安価、かつ大量に得られる技術が確立されており、さらにIgY抗体は、リウマチ因子との結合性がほとんど無いなど、臨床診断薬の材料としてのメリットも大きく、本発明には好ましい免疫動物である。

【0022】

本発明の1-ステップサンドイッチアッセイは、抗体：抗原：抗体のサンドイッチに依存するので、MK抗原に対する結合を、たがいに妨害せず、MKタンパク質分子上のnon-overlapping エピトープを認識する、2つの異なったポリクローナル抗体が、固相化抗体、および液相(標識)抗体として用いられる。両者は、サンドイッチを完成させる必要があるので、抗原と固相化抗体との結合を妨げる

標識抗体：抗原：標識抗体の複合体の形成の懸念なしに、reverseおよびsimultaneous サンドイッチアッセイを適用できる。

【0023】

固相および液相（標識）に用いる抗体は、反応の特異性や反応効率を向上させるため、アフィニティ精製抗体を用いることが望ましいが、3次抗体を用いる場合は、液相抗体は、必ずしもアフィニティ精製する必要はなく、抗血清のまま用いることも可能である。

【0024】

抗体の標識方法は、当業者に公知であり、例えば、Harlow and Lane編集のAntibodies [Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1988)] 参照。本発明においては、標識酵素として、Horseradish Peroxidaseが好適である。

【0025】

抗体の固相化のための不溶性の担体の例として、無機、および有機のポリマー、例えば、アミラーゼ、デキストラン、セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、磁性体 (magnetite)、多孔性ガラスパウダー (porous glass powder)、フッ化ポリビニリデン (polyvinylidene fluoride)、ラテックス、およびその他類するもの；試験容器の内壁、例えば、試験管、マイクロタイタープレート、またはグラスキューベット、または固体表面みならず合成物質、例えばロッド、ビーズ、またはその他のガラス体などである。ガラスビーズ、または合成物質は、本発明に特に好適である。抗体の不溶性担体への結合は、物理的（吸着）、または化学的に行うことができる。

【0026】

検査診断のためのカットオフ値の設定には、健常者の測定値の分布の95%信頼区間（基準範囲）の上・下限値が用いられることが多い。しかし、基準範囲の設定では、病態の分布が一切考慮されていない。そこで、カットオフ値は、その検査で識別すべき病態を明確に定義し、それに基づいて、その疾患群と非疾患群を一定数集め、検査し、2群の測定値の分離度（検査の分別能）と有病率（検査が適用される状況）を考慮して決める。

【0027】

【発明の実施の形態】

通常“癌”あるいは“がん” cancerという言葉は、癌腫だけでなく肉腫を含み、悪性新生物malignant neoplasmsを総称している。癌は組織学的に、上皮組織由来の癌腫carcinomaと、非上皮組織由来の肉腫sarcomaの2つに分類される。癌腫は、臓器別に関係なく、いずれの上皮性組織から発生したかによって、腺癌adenocarcinoma、扁平上皮癌squamous cell carcinoma、移行性上皮癌transitional cell carcinomaなどに分類される（小林 博：現代病理学大系，9A：21-35，中山書店，1985）。腺癌は、発生場所としては胃腸管、子宮、胆嚢、肺、乳腺、甲状腺などの腺性臓器である。機能的に分泌作用を営み、管腔内あるいは組織間隙に粘液その他を分泌するものがある。

【0028】

癌の肉眼的進展度による分類として、TNM分類（tumor-node-metastasis staging）が国際的に広く用いられているが、本発明で用いられる“ステージ分類”は、TNM分類に対応している〔臨床・病理 原発性肝癌取り扱い規約：22p。日本肝癌学会編（改訂第3版），金原出版，1992〕。

【0029】

血清サンプル

健常者135名（男性：94名、女性：41名；年齢21～75）、およびステージ1～7の腺癌患者72名（ステージ1：23、ステージ2：9、ステージ3：7、ステージ4：9、ステージ5：5、ステージ6：9、およびステージ7：10）の各個人の血液から血清を調製した。また、ステージ1～4の肝癌患者（ステージ1：7、ステージ2：19、ステージ3：23、および4：27）、およびウイルス肝炎患者7名の血液から血清を調製した。血清は、ただちに凍結し、アッセイまで-20℃で保存した。

【0030】

MKと肝癌ステージとの関係

肝癌の90%は、肝細胞癌（hepatocellular carcinoma：HCC）である。そこでHCCの各ステージと、該ステージにおける血清中のMKのレベルとの相関

を調べた。

肝癌の各ステージ（１～４）、肝疾患対照としてウイルス肝炎患者、および正常値として健常人、のそれぞれの血清中のMKレベルを、１-ステップサンドイッチ法で測定した。結果を図１に示す（ $p < 0.01$ ；統計ソフト；StatView-J5.0を使用）。バーは標準偏差を示す。肝癌は、ステージ１から血清中のMKレベルが、健常者MKより高くなっていることが認められる。

肝癌ステージの変化と血清MKレベルとの相関を回帰分析すると、図２の相関図に示すように直線回帰となる。 $n = 64$ で、相関係数 $R = 0.612$ と、ステージの大きさと血清MKレベルとの間には、かなり強い相関があるといえる。

【００３１】

比較対照試験

肝癌の腫瘍マーカーには、AFP、PIVKA-II、novel γ -GTP、variant ALPなどがあるが、これらの中で、現在、優れたマーカーとして使用されているAFPとPIVKA-IIを比較対照に選んだ。AFPは肝疾患の程度に特異的であり、PIVKA-IIは肝癌に特異的であると言われている。

血清検体は、MKレベルを測定した検体と同一検体を用いた。血清中のAFPレベルを、 α -フェト・リアビーズ（ダイナボット社）を用いて測定した。測定方法は、イムノラジオメトリックアッセイ（IRMA）である。結果を図３（図中のバーは標準誤差を示す）に示す。

AFPは、ステージ１では検出されず、ステージ２から初めて検出されることが認められる。しかも実際、各ステージでの標準偏差が大きく、ステージ毎の値の特異性が確認できない。肝癌の早期ステージでのAFP値の上昇（反応物質の単位量当たりの応答変動：感度）が小さいため、早期癌の診断には使用されていない（ステージ３以上より健常者と比較して有意に上昇するものがあるといわれている）。また、AFPは、肝癌への特異性はそれほど高くはなく、そのためにPIVKA-IIとのセットで、肝癌を検査することが多い。

血清中のPIVKA-IIは、エイテストPIVKA-II（三光純薬株式会社）を用いて測定した。測定方法は、酵素免疫測定法（EIA）である。結果を図４（図中バーは標準誤差を示す）に示す。図よりステージ３から陽性と診断される可能性が示唆

されるが、各ステージの標準偏差が大きく、ステージ間の測定値に優位な差を認めることはできない。

すなわち、MKは、肝癌の血清腫瘍マーカーとして、AFPやPIVKA-IIよりも早いステージの肝癌の検出が可能であり、また、肝癌のステージと血清中のMK濃度上昇との間には強い相関関係が認められた。

早期の肝癌ステージの血清MKレベルの値をおさえておけば、肝癌を疑ってきた患者に対して、次の適切な処置に進める大きな目安になる。また、肝癌を切除した患者の再発モニターとしてもMKは非常に有効である。既存のAFPやPIVKA-IIの挙動とMKは相関しないというデータもあるので、MKは、肝癌を早期に診断する血清マーカーとして期待できる。

【0032】

MKと胃癌ステージとの関係

腺癌の一つである胃ガンのステージについては、ステージ4以降は、手術不可といわれ、ステージ4までの早期に、癌を発見できるかどうか、その後の予後を決定づけるとされている。

そこで、MKレベルを測定した検体と同一検体を用いて、胃癌患者の各ステージの血清中のMKレベルを1-ステップサンドイッチ法で測定した。結果を図5に示す（図中バーは標準偏差を示す）。図から、健常者群(Normal)と比較して、ステージ4から血清中のMK濃度が有意 ($p < 0.01$; 統計ソフト; StatView-J5.0を使用) に高くなっていることが認められる。ステージの変化と血清MKレベルとの相関を回帰分析すると、図6の相関図に示すように直線回帰となる。 $n = 58$ で、相関係数 $R = 0.74$ と、ステージの大きさと血清MKレベルの間には、強い相関があるといえる。

【0033】

比較対照試験

比較対照の腫瘍マーカーとして、CEA（癌胎児性抗原; carcino-embryonic antigen）、およびCA19-9を選んだ。CEAは、肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌、甲状腺髄様癌などの進行期に、高率に陽性となると報告されている。CA19-9は、膵癌、胆道系癌で高値を示すといわれている。

血清検体は、MK レベルを測定した検体と同一検体を用いた。血清中の CEA レベルを CEA リアビーズ（ダイナボット社）を用いて測定した。測定方法は、IRMA である。結果を図 7 に示す（図中のバーは標準誤差を示す）。CEA は、ステージ 7 から陽性と診断される可能性が示唆されるが、各ステージでの標準偏差が大きく、ステージ間での有意差が認められない。

血清中の CA19-9 は、セントコア CA19-9RIA キット（Centocor 社；正常値：37U/ml 以下、）を用いて測定した。測定方法は、IRMA である。結果を図 8 に示す（図中バーは標準誤差を示す）。CA19-9 は、ステージ 5 でのみ高値を示しているため、ステージとの相関性は期待できないと推測される。

すなわち、腺癌の血清腫瘍マーカーとして、MK は、CEA や CA19-9 よりも早いステージの腺癌の検出が可能であり、また、腺癌のステージと血清中の MK 濃度上昇との間には強い相関関係が認められる。

癌には多段階発癌という考え方があり、例えば腺癌の一つ、膵癌でも検討されている（Molecular Medicine, vol 36, No.4, 1999, p434-439）。多段階の発癌過程で、多くの癌に関連していると考えられている因子が発現してくることが確認されている。すなわち、K-ras, p53, c-jun, TGF- α , テロメラーゼ活性などである。しかし、ここでも、MK の出現は早く、癌の発生段階の初期に出現することがわかる。

ステージ 4 以降は、転移等が激しく、外科的な手術で対応することが困難であり、そのため、治療が、投薬、放射線等の治療に限定される。その結果、患者の「Quality of life」は著しく低下し、また平均余命も極端に短くなる傾向にある。つまり、癌全般に言われていることではあるが、早期に癌を発見することの重要性は、まさしくここにあると言える。患者の「Quality of life」を考えることは、国民医療費を考えることにも繋がると考えられる。早期に癌を発見し、直ちに適切な処置を行うことで、そうしない場合に発生する医療費を抑えることにもなる。

【0034】

【実施例】

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらの実施例に限定され

るものではない。

【0035】

【実施例1】 抗ヒトMKポリクローナル抗体の作製

免疫に用いるMKタンパク質、および標準物質 (standard material) として用いる組換えMKタンパク質 (以下、「MK」とも称する) は、特開平9-95454の実施例1に記載されている方法に準じて作製した。

ピキア酵母を宿主とする発現ベクターPHIL-D4に、ヒトMKのORFをカバーするcDNAを導入した。このMK発現ベクターを、ピキア酵母G115 (ピキアパストリス G115; Research Corporation Technologies) にトランスフェクションした。ヒスチジンおよびG418選択によりMK発現クローンを得た。MKは、イオン交換クロマトグラフィーおよびヘパリンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製MKタンパクの神経栄養活性は、L細胞が産生したマウスMKのそれと類似していた。

ウサギ、およびニワトリに対する免疫注射は、ウサギの場合は、2週間おきに計6回、ニワトリの場合は、2週間おきに計8回行った。

すなわち、ウサギの場合は、初回に、400 μ gのMKをフロイント完全アジュバントと等量混合したものを、ウサギの皮下に注射し、2回目以降は、1回あたり400 μ gのMKをフロイント不完全アジュバントと混合したものを皮下に注射した。ニワトリの場合は、1回あたり100 μ gのMKを用いニワトリに注射した他は、ウサギと同様であった。

ウサギから得た抗血清は、硫酸で塩析した後、プロテインAカラムでIgGを単離し、さらに、MKをAffigel-10TM (Bio Rad) に固定化したMKアフィニティカラムにより、アフィニティ精製して、精製ウサギ抗MK特異的抗体を得た。一方、ニワトリから得た抗血清は、硫酸で塩析の後、MKアフィニティカラムでアフィニティ精製して、精製ニワトリ抗MK特異的抗体を得た。これらの抗体は、ウエスタンブロット解析でヒトMKを特異的に検出した。

【0036】

【実施例2】 サンドイッチ法によるMKの測定

ウサギ抗MK抗体を、0.1% NaN₃を含む50 mM PBS (pH7.2) に溶

解 ($5.5 \mu\text{g/ml}$) し、その $5.0 \mu\text{l}$ を、マイクロタイタープレート (Polysorp plates, Nunc) の各ウェルに分注した。室温で 16 時間抗体を吸着させた。0.1 % Tween 20 を含む PBS で洗浄後、0.5 % BSA を含む PBS $150 \mu\text{l}$ を各ウェルに加え、 37°C で 2 時間ブロックキングした。一方、肝癌及び腺癌血清サンプル、あるいは健常人血清サンプル (コントロール) 各々 $10 \mu\text{l}$ は、0.5 M KCl、0.5 % ウシ血清アルブミン (BSA)、0.01 % Microcide I (aMReSCO, Solon, Ohio) 含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.4) に溶解したペルオキシダーゼ標識ニワトリ抗ヒト MK 抗体 ($0.1 \mu\text{g/ml}$) $100 \mu\text{l}$ と反応させた。この反応液 $50 \mu\text{l}$ を、マイクロタイタープレートの各ウェルに加え、室温で 1 時間インキュベーションした。各ウェルを、1% Tween 20 を含む PBS で 5 回洗浄した。基質溶液 (0.5mg/ml の tetramethylbenzidine) $100 \mu\text{l}$ を各ウェルに加え、室温で 30 分間インキュベートした。2 N- H_2SO_4 を加えて反応を停止し、450nm における吸光度を multiplate reader (Model 3550, BioRad) を用いて測定した。

【0037】

【発明の効果】

本発明により、早期癌の補助診断に有用な血清腫瘍マーカーが提供された。該腫瘍マーカーは、早期癌のスクリーニング、ステージと予後の推定、治療経過のモニタリングとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 肝癌の各ステージ (1~4)、肝疾患対照として、ウイルス肝炎患者、および正常値として健常者、それぞれの血清中の MK レベルを、1-ステップサンドイッチ法で測定した図である。エラーバーは標準偏差を示す ($p < 0.01$)。

【図2】 肝癌の各ステージ (1~4) の変化と、血清中の MK レベルとの相関を回帰分析した図である

【図3】 肝癌の各ステージ (1~4) の血清中の AFP レベルを、 α -フェット・リアビーズ (ダイナボット社) を用いて測定した図である。エラーバーは標準誤差を示す。

【図4】 肝癌の各ステージ (1~4) の血清中の PIVKA-II レベルを、エイ

テストPIVKA-II（三光純薬株式会社）を用いて測定した図である。エラーバーは標準誤差を示す。

【図5】 胃癌の各ステージ（1～7）、および健常者のそれぞれの血清中のMKレベルを1-ステップサンドイッチ法で測定した図である。エラーバーは標準偏差を示す。（ $p<0.01$ ）。

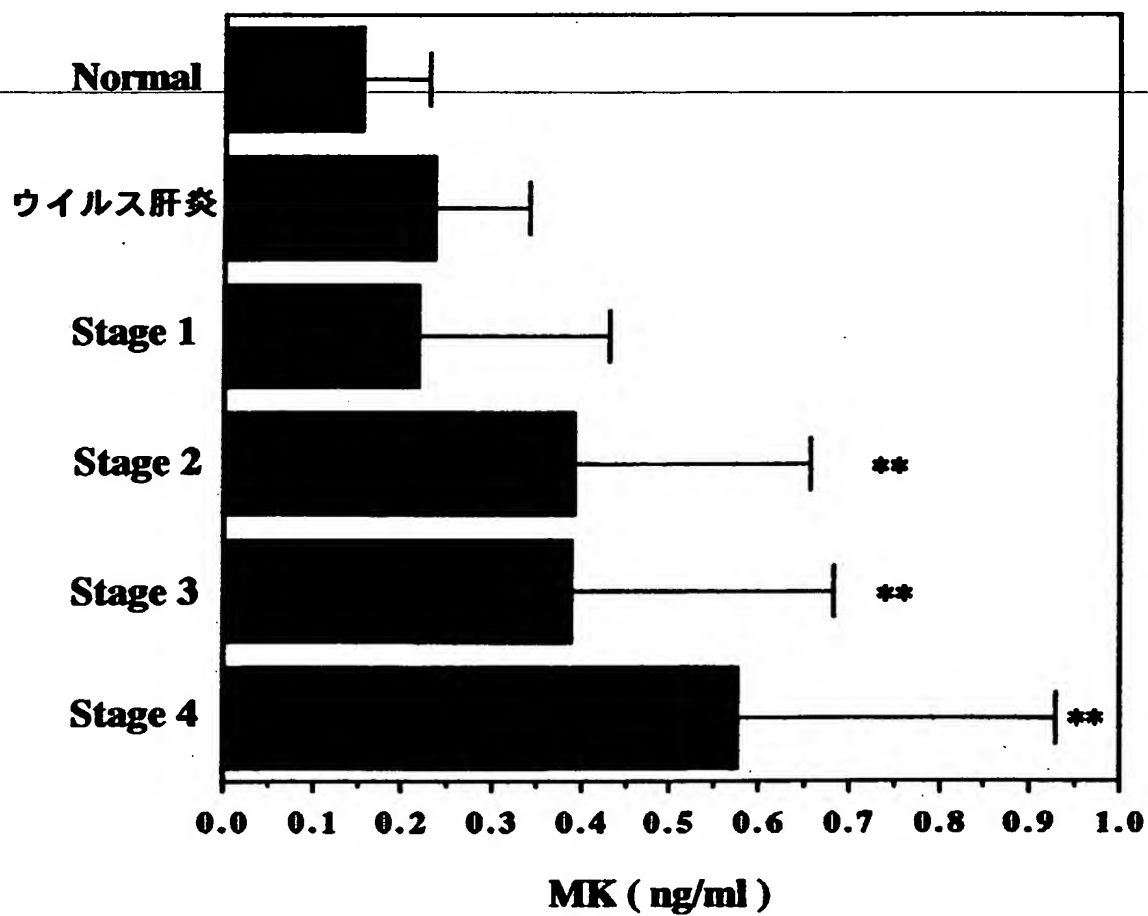
【図6】 胃癌の各ステージ（1～7）の変化と、血清中のMKレベルとの相関を回帰分析した図である

【図7】 胃癌の各ステージ（1～7）の血清中のCEAレベルを、CEAリアビーズ（IRMA法）（ダイナボット社）を用いて測定した図である。エラーバーは標準誤差を示す。

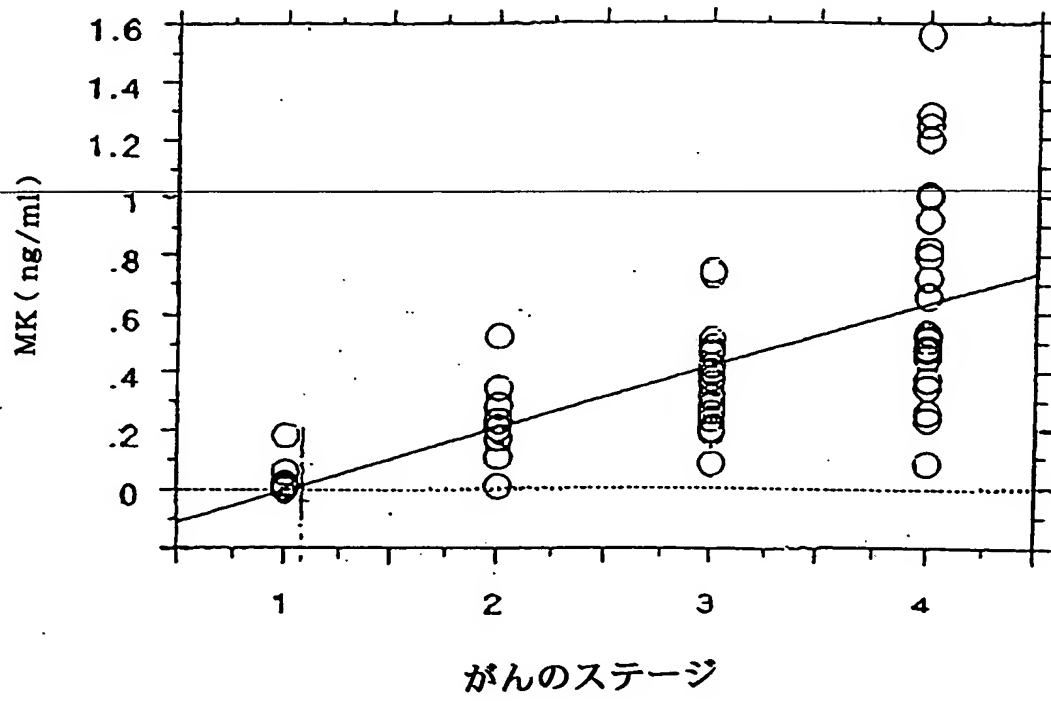
【図8】 胃癌の各ステージ（1～7）の血清中のCA19-9レベルを、セントコアCA19-9RIAキット（IRMA法）（Centocor社）を用いて測定した図である。エラーバーは標準誤差を示す。

【書類名】 図面

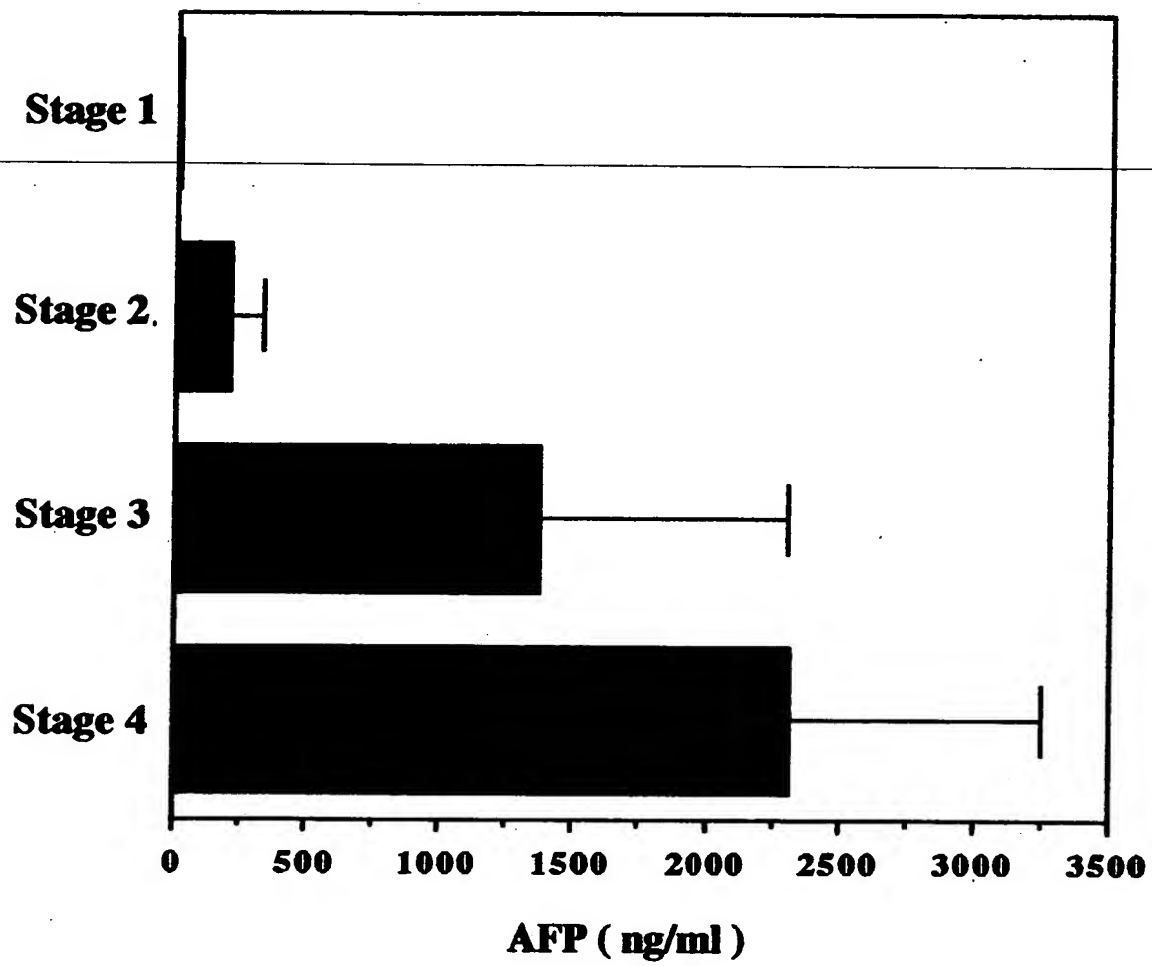
【図 1】



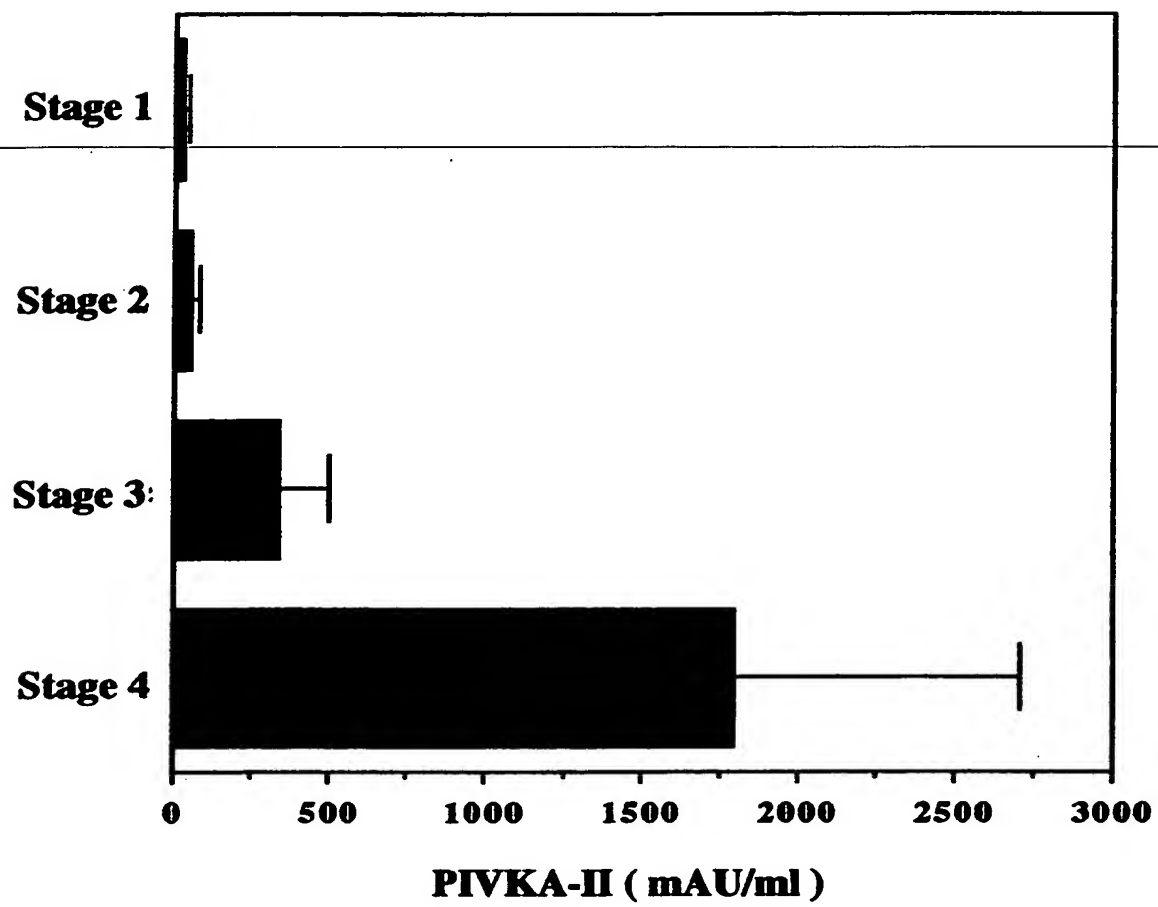
【図 2】



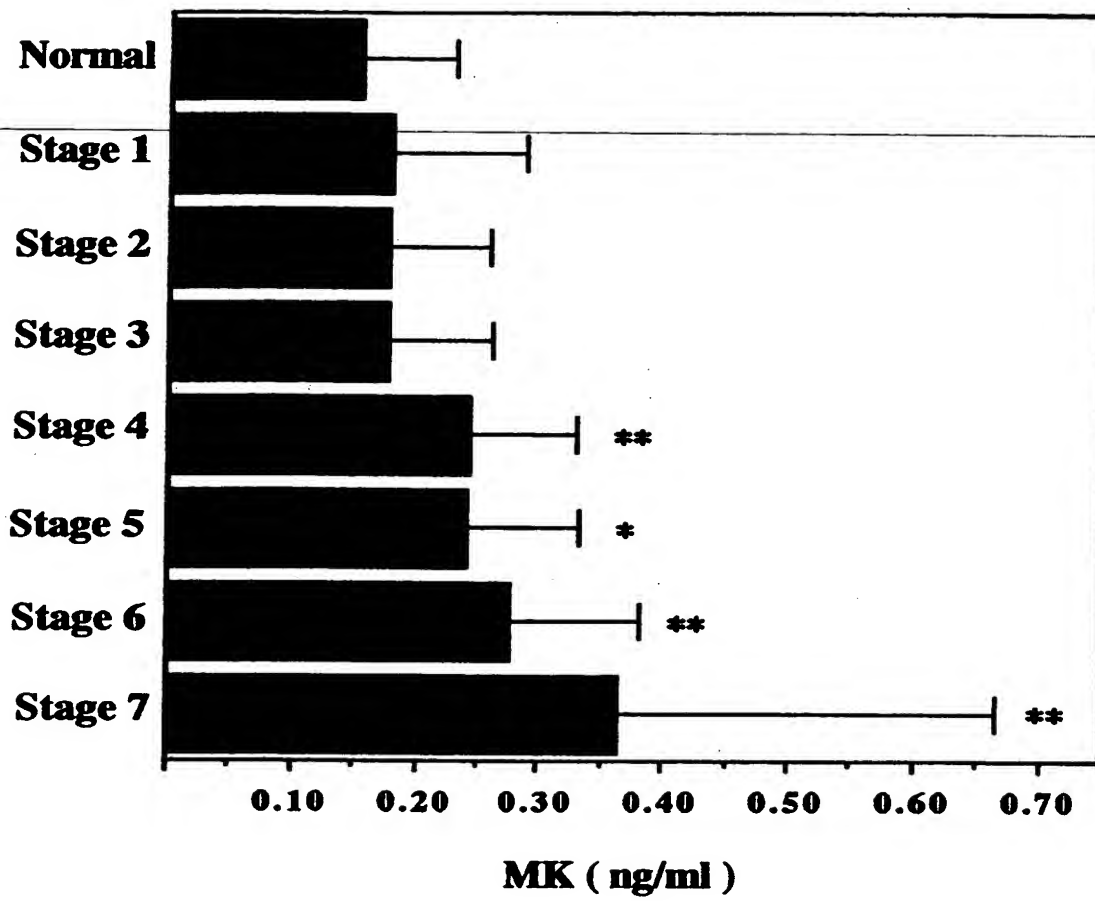
【図 3】



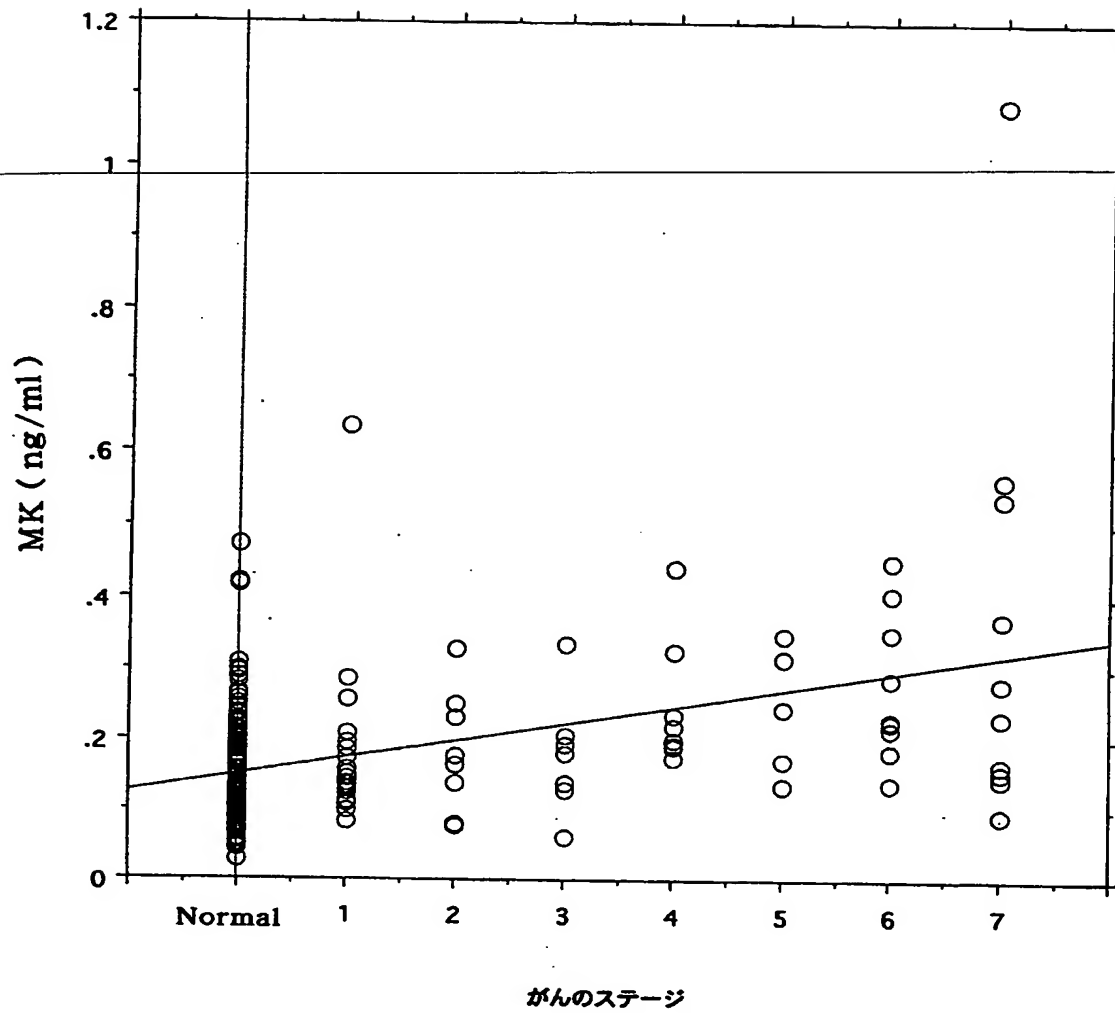
【図 4】



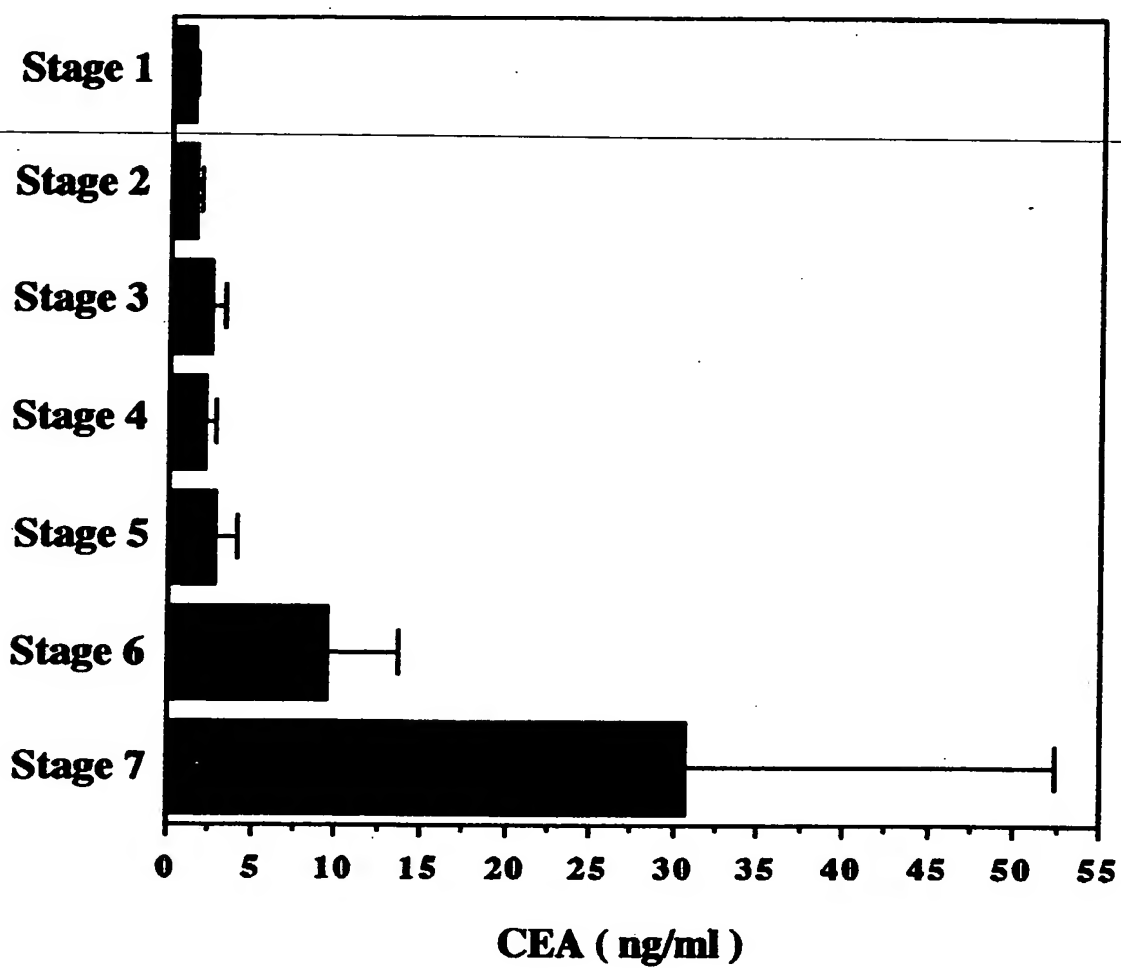
【図 5】



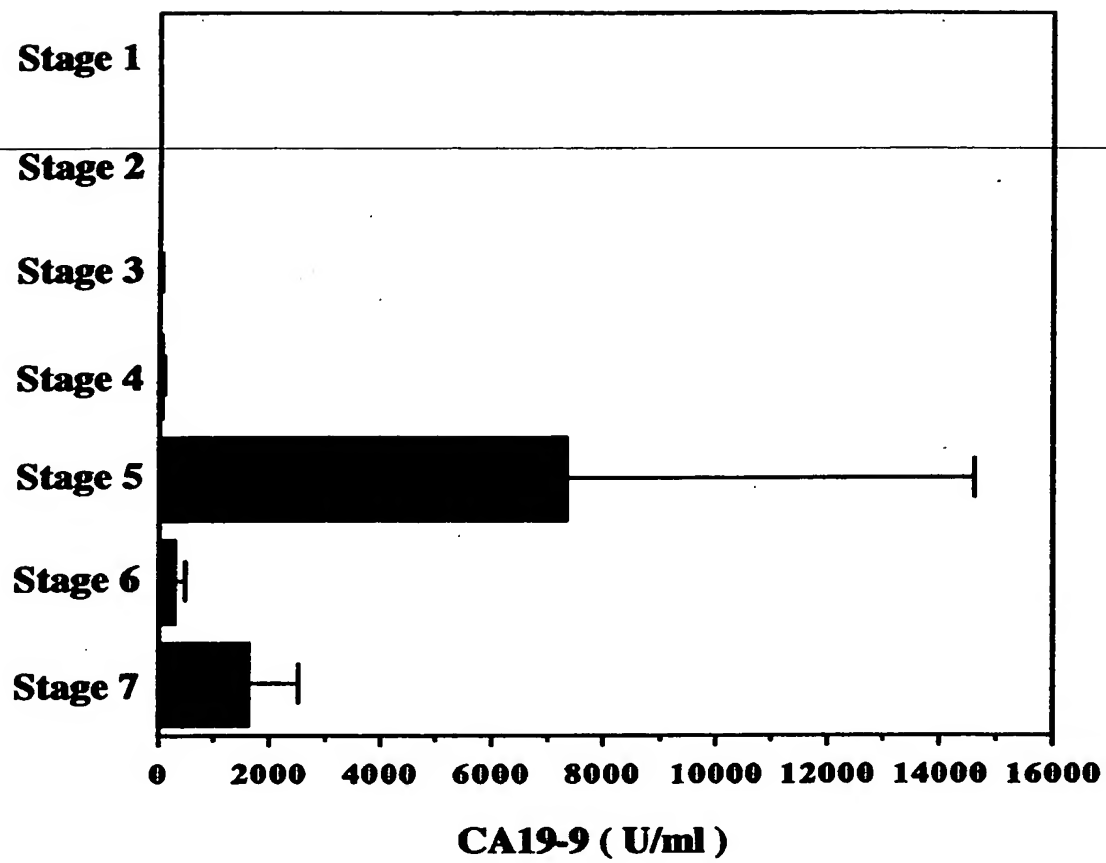
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 早期癌を診断するための血清腫瘍マーカー、および該マーカーを用いた早期癌の診断方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 癌患者の血清中には早いステージでMKタンパク質が出現し、該患者のステージと、血清MKタンパク質レベルとの間には強い相関があり、血清中のMKレベルを、早いステージで、1ステップサンドイッチアッセイにより検出することにより、早期癌を診断しうることを見出した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第256678号
受付番号	59900882509
書類名	特許願
担当官	濱谷 よし子 1614
作成日	平成11年11月29日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000006138
【住所又は居所】	東京都中央区京橋2丁目3番6号
【氏名又は名称】	明治乳業株式会社
【特許出願人】	
【識別番号】	591038945
【住所又は居所】	愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石28 45-161
【氏名又は名称】	村松 喬

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 6 1 3 8]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 1 4 日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区京橋 2 丁目 3 番 6 号
氏 名 明治乳業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 1 0 3 8 9 4 5]

1. 変更年月日 1 9 9 6 年 9 月 2 6 日

[変更理由] 住所変更

住 所 愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石 2 8 4 5 - 1 6 1

氏 名 村松 喬

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)